**Сравнение эффективности применения Большого Фрагмента Клёнова и Фрагмента Клёнова exo- при определении микроРНК-141 с применением изотермического амплификационного метода с полимеризацией и замещением**

***Соловьев А.М.,1 Сахаров И.Ю.1***

*Аспирант, 3 год обучения*

*1Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,*

*химический факультет, Москва, Россия*

*E-mail:* [*asol0850@gmail.com*](mailto:asol0850@gmail.com)

МикроРНК – класс малых некодирующих молекул РНК (18-24 нуклеотида). Они являются перспективными маркерами ряда онкологических, нейродегенеративных и сердечно-сосудистых заболеваний. Однако, в биологических образцах микроРНК содержатся в крайне низких концентрациях (фМ-пМ диапазон), поэтому задача разработки высокочувствительных методов их определения является чрезвычайно важной и востребованной для клинической диагностики.

Последнее время при конструировании новых методов определения микроРНК часто применяют изотермические методы амплификации нуклеиновых кислот. Среди таких методов одним из наиболее популярных является амплификационный метод с полимеризацией и замещением (АМПЗ) благодаря его простоте и эффективности. Одним из ключевых реагентов АМПЗ, определяющим эффективность амплификации, является ДНК-полимераза, обладающая замещающей активностью. В основном, в качестве такой полимеразы применяют Большой Фрагмент Клёнова (БФК) и Фрагмент Клёнова, лишенный 3’-5’-экзонуклеазной активности (ФКexo-). Однако, отсутствует информация, какой из этих ферментов, обладающих разными каталитическими свойствами, предпочтительнее использовать в АМПЗ.

В нашей работе проведено сравнение эффективности БФК и ФКexo-, использованных в гетерогенном методе определения микроРНК-141, сопряженном с АМПЗ. В этом методе анализа в соответствии с теорией АМПЗ продуктом каскада реакций является дуплекс, сформированный исходным захватывающим зондом и удлиненным праймером. Показано, что при воздействии БФК (в присутствие dNTPs) на продукт, полученный в гетерогенном АМПЗ, количество иммобилизованного продукта со временем уменьшается, что обнаруживается по изменению аналитического сигнала. В то же время, обработка данного дуплекса с помощью ФКexo- не приводила к изменению сигнала. По-видимому, неизменность количества продукта в случае ФКexo- связана с отсутствием у этого фермента 3’-5’-экзонуклеазной активности.

Так как найденный эффект может приводить к снижению степени амплификации и, соответственно, к уменьшению чувствительности анализа, разработанного с применением АМПЗ, применение ФКexo- вместо БФК может позволить улучшить аналитические параметры метода анализа. При проверке этой гипотезы показано, что в случае применения ФКexo- предел обнаружения микроРНК-141 равен 1,7 фМ. Данная величина в 30 раз ниже величины предела обнаружения с применением БФК. Более того, коэффициент чувствительности анализа при использовании ФКexo- увеличился более, чем в 3 раза по сравнению с использованием БФК. Таким образом, показано, что при проведении АМПЗ предпочтительнее использовать ФКexo-.

*Работа выполнена в рамках российско-китайского проекта, финансируемого РФФИ/Государственным фондом естественных наук Китая (21-54-53007/2201101378).*